

(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl. A61K 31/19	(11) 공개번호 (43) 공개일자	특2002-0032577 2002년05월03일
(21) 출원번호	10-2002-7003107	
(22) 출원일자	2002년03월08일	
번역문 제출일자	2002년03월08일	
(86) 국제출원번호	PCT/US2000/24659	
(86) 국제출원출원일자	2000년09월08일	
(87) 국제공개번호	WO 2001/17523	
(87) 국제공개일자	2001년03월15일	
(81) 지정국	국내특허: 오스트레일리아, 캐나다, 중국, 이스라엘, 일본, 대한민국, 미국 EP 유럽특허: 오스트리아, 벨기에, 스위스, 독일, 덴마크, 스페인, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투갈, 스웨덴, 핀란드, 사이프러스	
(30) 우선권주장	60/153,378 1999년09월10일 미국(US)	
(71) 출원인	어플라이드 제네틱스 인코포레이티드 더마틱스, 추후제출 미국 미국 뉴욕주 프리포트 버팔로 애버뉴 205(우:11520)	
(72) 발명자	브라운데이빗에이 미국 미국뉴욕주11566메릭센츨얼파크웨이44 야로쉬대니얼비 미국 미국뉴욕주11566메릭쇼어드라이브2915	
(74) 대리인	신정건 김두규	
(77) 심사청구	없음	
(54) 출원명	피부 지질 함량 조절을 위한 조성물 및 방법	

명세서

발명의 배경

1. 발명의 분야

당업계에서 주지되어 있는 바와 같이, 포유 동물 피부의 표피 및 진피는 각종 유형의 세포를 포함하며, 다양한 기능을 수행하고 다양한 화학적 조성물을 갖고 있다. 이러한 피부층간에는 이들의 지질 농도가 다르다는 점이 중요하다. 진피는 콜라겐과 기타의 단백질은 생성하나, 매우 소량의 지질을 생성하는 섬유아세포를 함유한다. 이와는 반대로, 표피는 그 중에서도 지질은 생성하나 콜라겐은 실질적으로 생성하지 않는 각질세포를 함유한다. 섬유아세포에 의해 생성된 콜라겐은 피부에 신장 강도를 부여하게 된다. 각질세포에 의해 생성된 지질은 생조작과 외부 세계간의 차단층을 제공한다.

본 발명은 우르솔산(ursolic acid), 우르솔산 유사체, 우르솔산 유도체, 우르솔산 유사체의 유도체 또는 이들의 조합물의 국소 투여에 의해 외관의 변형, 기능의 향상, 활력의 증진, 노화 영향의 복귀, 광손상 효과의 복귀 또는 질환의 치료를 목적으로 한 피부의 지질 함량의 조절에 관한 것이다. 피부 지질은 표피에 위치하기 때문에, 이러한 피부의 지질 함량의 조절은 표피층에서 발생하게 된다. 이해의 편의를 도모하기 위하여, 본 명세서에서는 우르솔산, 우르솔산 유사체, 우르솔산 유도체, 우르솔산 유사체의 유도체 또는 이들의 조합물을 간편하게 "우르솔산 화합물"로 지칭하기로 한다. 우르솔산 화합물은 리포좀 중에 캡슐화되거나 또는 국소 투여에 적절한 기타의 제형으로 투여할 수 있다.

2. 관련 분야의 설명

A. 특허 문헌

미국 특허 제4,857,554호에는 바셀린/라놀린 담체 중에 분산된 우르솔산 및 올레아놀산을 함유하는 연고를 적용함으로써 건선을 치료하는 "건선 치료법"이 개시되어 있다.

미국 특허 제4,530,934호에는 궤양을 치료하기 위하여 우르솔산의 활성 유도체를 사용하는 "약학적 활성 우르솔산 유도체"가 개시되어 있다.

미국 특허 제3,903,089호에는 우르솔산 유도체 및 유사체의 합성에 관한 "우르솔산 유도체"가 개시되어 있다.

미국 특허 제5,624,909호에는 트리테르페노이드산 유도체의 투여에 의해 염증을 완화시키는 "세포 유착 분자 ELAM-1 (e-셀렉틴) 및 LECAM-1 (l-셀렉틴)의 억제제로서의 트리테르페노이드산의 유도체"가 개시되어 있다.

미국 특허 제5,314,877호에는 시클로덱스트린 중에서의 배합에 의해 수중에 가용성인 우르솔산, 올레아놀산 및 관련 트리테르페노이드를 생성하는 것인 "수용성 5중환 트리테르펜 조성물 및 이의 제법"이 개시되어 있다.

미국 재발행 특허 RE036068호에는 레티노이드의 국소 적용에 의해 광손상의 효과를 복귀시키는 것인 "레티노이드를 사용한 태양광선에 의해 손상된 사람 피부의 치료법"이 개시되어 있다.

미국 특허 제5,051,449호에는 레티노이드의 국소 도포에 의해 피부에서의 셀룰라이트(cellulite) 축적의 지연 또는 복귀에 관한 것인 "레티노이드를 사용한 셀룰라이트의 치료"가 개시되어 있다.

미국 특허 제5,556,844호에는 레티노이드의 국소 적용에 의하여 상피 증식, 표피 각질화 질환 또는 피지 기능 질환을 치료하는 것인 "레티노이드 및 스테롤의 조합물을 함유하는 의약 또는 화장 조성물"이 개시되어 있다.

미국 특허 제5,075,340호에는 레티노산 글루코로나이드의 국소 적용에 의해 레티노이드 피부염의 예방 및 여드름 또는 주름진 피부의 치료에 관한 것인 "피부 적용을 위한 레티노산 글루코로나이드 제조"가 개시되어 있다.

미국 특허 제5,837,224호에는 UVB-유발성 기질 금속단백분해효소를 억제하는 제제의 국소 적용에 의해 광손상 영향을 복귀시키는 것인 "피부의 광노화 억제법"이 개시되어 있다.

B. 논문

Tokuda, H., H. Ohigashi, K. Koshimizu, and Y. Ito. 1986. Inhibitory effects of ursolic and oleanolic acid on skin tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Cancer Lett.* 33:279-285.

Ponec, M., and A. Weerheim. 1990. Retinoids and lipid changes in keratinocytes. *Meth. Enzymol.* 190:30-41.

Griffiths, C. E. M., A. N. Russman, G. Majmudar, R. S. Singer, T. A. Hamilton, and J. J. Voorhees. 1993. Restoration of collagen formation in photodamaged human skin by tretinoin (retinoic acid). *New Engl. J. Med.* 329:530-5.

Kligman, A. M., and J. J. Leyden. 1993. Treatment of photoaged skin with topical tretinoin. *Skin Pharmacol.* 6 (Suppl.1):78-82).

Huang, M.-T., C.-T. Ho, Z. Y. Wang, T. Ferraro, Y.-R. Lou, K. Stauber, W. Ma, C. Georgiadis, J.D. Laskin, and A.H. Conney. 1994. Inhibition of skin tumorigenesis by rosemary and its constituents carnosol and ursolic acid. *Cancer Res.* 54:701-708.

Liu, J. 1995. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. *J. Ethnopharmacol.* 49:57-68.

Manez, S., C., C. Recio, R.M. Giner, and J.-L. Rios. 1997. Effect of selected triterpenoids on chronic dermal inflammation. *Eur. J. Pharmacol.* 334:103-105.

Ponec, M., A. Weerheim, J. Kempenaar, A. Mulder, G.S. Gooris, J. Bouwstra, and A. M. Mommaas. 1997. The formation of competent barrier lipids in reconstructed human epidermis requires the presence of Vitamin C. *J. Invest. Dermatol.* 109:348-355.

Griffiths, C. E. M. 1999. Drug treatment of photoaged skin. *Drugs & Aging* 14:289-301.

일본 특허 공보 제11-5727호(1999년 1월 12일 발행)에는 진피 콜라겐을 증가시키기 위해 최종 화장품에 레티놀과 조합된 우르솔의 용도가 기재되어 있다. 상기에서 논의한 바와 같이, 콜라겐은 섬유아세포에 의해 진피에 위치하여 여기서 생성된다. 한편, 본 발명은 각질세포에 의한 표피에 존재하고, 여기서 생성되는 지질의 함량의 조절에 관한 것이다.

3. 표피 지질 조성 및 분화종의 변화

피부의 표피는 하기에 제시되어 있는 바와 같이 분화 중에 변경되는 각종의 지질을 함유한다. 문헌[Downing et al., 1993, p210-221, In: *Derm* (i) 인지질: 가장 통상적인 인지질로서는 포스파티딜콜린, 포스파티딜에탄올아민, 포스파티딜세린, 포스파티딜이노시톨 및 스팅고미엘린 등이 있다. 인지질은 표피의 기저층에서 가장 풍부한 지질이기는 하나, 각질화층에서는 가장 적은 지질 중의 하나가 될 정도로 피부면으로 갈수록 감소하게 된다. 그래서, 각질세포의 인지질 함량은 이들이 분화됨에 따라 감소하게 된다. 반대로, 고농도의 인지질은 각질세포 증식과 관련이 있다.

(ii) 유리 지방산: 유리 지방산은 주로 포화된 상태로 존재하며, C₁₄ -C₂₈ (마리스탄=C₁₄, 팔미트산=C₁₆, 스테아르산=C₁₈, 아라키드산=C₂₀, 베헨산=C₂₂, 리гно세르산=C₂₄, 세로트산=C₂₆)로 존재한다. 피부에서의 가장 흔한 지방산은 C₂₂ (15 중량%) 및 C₂₄ (27 중량%) 종이 있다.

(iii) 트리글리세라이드: 인지질에서 글루코실세라마이드로의 지방산의 전이에서 중간체로서 작용하는 소량의 지질 성분이다.

(iv) 글루코실세라마이드 A, B, C-1, C-3, D-1, D-2, C-2:

또한, 아실글루코실세라마이드로서 공지되어 있는 글루코실세라마이드 A는 이와 같은 지질군의 56 중량%를 포함하는 주요 구성원이다. 글루코실세라마이드 A에서의 아실기는 종종 ω-히드록시산의 히드록실기에 결합되어 있는 리놀레산이다. 문헌[Abraham, Wertz and Downing, 1985, *J. Lipid Res.* 26:761-766].

(v) 세라마이드 1-7: 세라마이드는 각질층에서의 주요한 지질이다. 이들은 표피 분화 과정의 중반에 글루코실세라마이드의 탈글루코실화 반응에 의해 생성된다. 세라마이드 1은 글루코실세라마이드 A로부터 유도되며, 세라마이드 2는 글루코실세라마이드 B로부터 유도되고, 세라마이드 3은 글루코실세라마이드 C-1으로부터 유도되며, 세라마이드 4는 글루코실세라마이드 C-3로부터 유도되고, 세라마이드 5는 글루코실세라마이드 D-1으로부터 유도되며, 세라마이드 6-A는 글루코실세라마이드 D-2로부터 유도되고, 세라마이드 6-B는 글루코실세라마이드 C-2로부터 유도된다. 글루코실세라마이드 A가 56 중량%의 글루코실세라마이드를 포함하기는 하나, 세라마이드 1은 8 중량%의 추출성 세라마이드만을 포함하는데, 이는 이들 대부분이 ω-히드록시세라마이드로 전환되어서 각질화된 세포 피막 단백질의 글루타메이트에 공유 결합되며, 그리하여 각각의 각질세포의 주위에서 보호층을 형성하게 된다. 세라마이드 2는 이러한 군의 42 중량%를 차지한다. 세라마이드 6 (피토스핑고신) 및 세라마이드 7 (6-히드록시-4-스핑게닌)은 함께 20 중량%를 차지한다.

(vi) 콜레스테롤: 이 지질은 30 몰%의 각질층액을 포함하도록 각질세포가 분화됨에 따라 증가하게 된다. 문헌[Schaefer and Redelmeier, 1996]

(vii) 콜레스테롤 설페이트: 이 지질은 세포간 콜레스테롤 설페이트 칼슘 가교를 형성함으로써 세포 응집력을 증가시킨다.

(viii) 콜레스테롤 에스테르: 표피 분화의 최종 단계 중에, 인지질은 분해되어 지방산을 방출하게 되며, 이는 콜레스테롤 에스테르를 생성하는데 사용된다.

돼지 피부를 통한 연속 절편에서의 지질의 검사에 의하면 하기와 같다. 문헌[Cox and Squier, 1986, J. Invest. Dermatol. 87:741-744]: (i) 표면에 대한 글루코실세라마이드와 세라마이드 모두가 증가되나, 최상층에서의 세라마이드의 증가와 동시에 글루코실세라마이드는 감소한다. (ii) 피부의 표면층에 대한 인지질이 감소한다. (iii) 피부의 표면층에 대한 트리글리세라이드, 콜레스테롤 및 콜레스테롤 에스테르를 점진적으로 증가시킨다. (iv) 콜레스테롤 설페이트의 점진적인 증가후, 최상층에서 급격히 감소한다(설파타제에 의한 표피탈락과 관련됨).

문헌[Ponec and Weerheim, 1990, Meth. Enzymol. 190:30-41]에 의하면, 정상 표피 말단 분화는 인지질의 상실에 의해 표시되며, 스테롤 및 특정 부류의 스프링고지질이 증가되고, 분화의 최종 각질층 지질 산물은 주로 세라마이드 및 비극성 지질로 이루어진다. 전반적으로, 분화 중 지방산의 흐름은 인지질로부터, 트리글리세라이드, 세라마이드 및 최종적으로 히드록시세라마이드가 되는 것으로 나타났다. 문헌[Swartzendruber et al., 1987, J. Invest. Dermatol. 88:709-713; Ponec et al., 1997, J. Invest. Dermatol. 109:348-355]. 그리하여, 분화 중의 대사 지질 흐름은 각질층내의 히드록시세라마이드의 형성에 관여하는 것으로 나타났다. 히드록시세라마이드는 각질화 중에 이의 다수의 글루타메이트 잔기(20%)를 경유하여 인플루크린에 결합되어 있어서, 피부의 매우 유효한 차단 기능을 제공하게 된다. 문헌[Swartzendruber et al., 1987, J. Invest. Dermatol. 88:709-713].

4. 표피 지질을 변화시키는 것으로 판명된 제제

레티노산은 분화 중에 발생하는 지질 합성의 변화를 복귀시킬 수 있어서, 생 피부 등가물에서 인지질 3-4 배 증가, 스프링고지질(특히 세라마이드) 3 배 감소, 아실세라마이드 9 배 감소, 콜레스테롤 및 콜레스테롤 설페이트 거의 2 배 감소, 라노스테롤 6 배 감소 및 FFA 3 배 감소된다. 문헌[Ponec and Weerheim, 1990, Meth. Enzymol. 190:30-41]. 그리하여, 피부에서 천연 발생하는 최종 분화와, 레티노산을 사용한 치료의 결과로 발생하는 세포성 프로그램 재편성에는 뚜렷한 차이점이 있는 것으로 나타났다.

비타민 C ($50 \mu\text{g}/\text{ml}$)는 생피부 등가물에서 글루코실세라마이드와 세라마이드를 증가시키며, 특히 세라마이드 6 및 7을 증가시키는 것으로 밝혀졌다. 문헌[Ponec et al., 1997, J. Invest. Dermatol. 109:348-355]. 이러한 증가로 인해서 증가된 차단 기능이 수반된다. 비타민 E는 소수성 이기는 하지만, 지질 조성에는 아무런 영향을 미치지 않기 때문에, 비타민 C의 주된 역할이 단백질 결합된 히드록시세라마이드의 형성에 대한 스프링고이드 염기 및 지방산으로의 히드록실기의 공여체인 것으로 결정되었다. 문헌[Ponec et al., 1997, J. Invest. Dermatol. 109:348-355].

5. 표피 지질에 대한 노화의 영향

표피 지질의 모든 주요 종은 노화 과정 중에 감소된다. 이는 노화에 따른 차단 기능이 크게 상실되기 때문에 세라마이드 분획이 감소되는 것에 유의한다. 문헌[Rogers et al., 1996, Arch. Dermatol. Res. 288:765-770]. 그러나, 총 표피 지질이 노년층에게서는 30% 정도로 감소되어 있기는 하나, 각각의 주 부류 지질의 비율은 노화 중에는 불변한다. 문헌[Rogers et al., 1996, Arch. Dermatol. Res. 288:765-770]. 노화와 함께 발생하는 가장 중요한 표피 지질의 변화로는 유리 지방산의 비율이 변화됨으로써 세라마이드 1 리놀레이트가 감소된다는 점에 있다. 문헌[Rogers et al., 1996, Arch. Dermatol. Res. 288:765-770]. 세라마이드 1 리놀레이트의 감소는 피부 건조증, 아토피성 피부염 및 여드름과 관련되어 있다. 문헌[Rogers et al., 1996, Arch. Dermatol. Res. 288:765-770].

6. 표피 지질에 대한 광손상의 영향

장기간 동안(3 주) UVA ($50 \text{ J}/\text{cm}^2$) 또는 UVB ($124 \text{ mJ}/\text{cm}^2$)로 매일 처치하면 사람 피부에서의 총 표피 지질이 약 2 배로 증가하며, 트리글리세라이드, 유리 지방산, 알칸, 스쿠알렌 및 세라마이드 분획이 증가하는 것으로 나타났다. 문헌[Wefers et al., 1991, J. Invest. Dermatol. 96:959-962]. 스테롤, 콜레스테롤, 콜레스테롤 에스테르 또는 콜레스테롤 설페이트 분획에서는 변화가 없는 것으로 나타났다. 문헌[Wefers et al., 1991, J. Invest. Dermatol. 96:959-962]. 이 연구에서 인지질에 대하여서는 조사하지 않았다. 이러한 결과와는 반대로, 단기간(24-48 시간)의 노출 후, UVA ($50 \text{ J}/\text{cm}^2$)는 생피부에서의 세라마이드 분획이 감소하였으며, 인지질의 상대적 비율은 증가한 것으로 나타났다. 문헌[Robert et al., 1999, Int. J. Radiat. Biol. 75:317-26]. 유사하게, 단기간 (24-48 시간) 노출 직후, UV-B ($0.15 \text{ J}/\text{cm}^2$)는 세라마이드가 크게 감소한 것으로 나타났다. 문헌[Holleran et al., 1997, Photoderm. Photoimmunol. Photomed. 13:117-128]. 그러나, UV-A와 달리, UV-B에의 단기간 노출로 인해서 인지질은 크게 손실(>2 배)된 것으로 나타났다. 문헌[Holleran et al., 1997, 상동].

7. 노화 및 광손상된 피부의 치료 방법

레티노산은 광노화된 피부의 치료에 사용되는 제제로서 주지되어 있다. 국소 레티노산은 광손상된 피부에서 감소된 콜라겐 I 수치를 회복시키는 것으로 밝혀졌다. 문헌[Griffiths et al., 1993, New Engl. J. Med. 329:530-5]. 콜라겐 I 수치의 회복은 피부에서의 잔주름의 감소와 상관 관계를 갖는다. 문헌[Griffiths et al., 1993, New Engl. J. Med. 329:530-5]. 레티노이드가 배양된 피부 등가물에서의 지질을 변화시키는 것으로 밝혀지기는 하였으나[문헌: Ponec and Weerheim, 1990, Meth. Enzymol. 190:30-41], 레티노이드가 지질 수치를 변화시킴으로써 노화 또는 광손상을 복귀시키는 것으로 보고되지는 않았다. 이는 부분적으로 레티노이드가 피부 등가물에서 세라마이드 수치를 감소시키고[문헌: Ponec and Weerheim, 1990, Meth. Enzymol. 190:30-41], 사람 피부에 국소 적용시 각질층의 두께가 감소하여 [문헌: Kligman and Leyden, 1993, Skin Pharmacol. 6, Suppl. 1:78-82] 노년층에서 나타나는 세라마이드 및 차단 기능의 상실이 나타나게 된다.

8. 우르솔산의 약리학적 용도

우르솔산은 다수의 약리학적 효능을 갖는 것으로 공지된 5중환 트리테펜 화합물이다. 문헌[Liu, 1995, J. Ethanopharmacol. 49:57-68]. 우르솔산은 스테로이드와 밀접한 관련이 있는데, 이는 이들 모두가 스쿠알렌의 환화로부터 유도되기 때문이다. 문헌[Suh et al., 1998, Cancer Res. 58:717-723]. 이는 헤더 및 로즈마리와 같은 많은 식물의 잎에서 그리고 과일의 왁스 코팅에서 발견된다. 이는 대부분의 용매에서 불용성이어서 광범위하게 사용되지는 않는다. 사실상, 식물잎을 위한 통상의 추출법은 우르솔산의 측정 가능한 농도를 복구하지 못한다.

우르솔산은 염증성 세포에서의 리폭시게나제 및 시클로옥시게나제의 억제제로서 특징을 갖는다. 문헌[Najid et al., 1992, FEBS 299:213-217; Suh et al., 1998, Cancer Res. 58:717-723]. 이와 같이, 우르솔산은 항염증제로서 유용할 것으로 예상된다. 우르솔산은 동물 모델에서의 포발(phorbol) 에스테르에 의해 유발되는 만성 피부 감염으로 나타난다. 문헌[Manez et al., 1997, Eur. J. Pharmacol. 334:103-105]. 또한, 우르솔산은 대식세포에서의 유발성 질산 산화물(nitric oxide) 신타제의 유발을 억제하는 것으로 나타났으며 문헌[Suh et al., 1998, Cancer Res. 58:717-723], 이는 항염증 활성에 기인할 수 있다.

또한, 우르솔산은 각종 유형의 세포의 분화 및 성장 정지를 유발하는 것으로 나타났는데, 이는 화학치료 분화제로서 유용할 것이라는 것을 암시한다. 문헌[Es-Saady et al., 1996, Cancer Lett. 106:193-197; Hsu et al., 1997, Cancer Lett. 111:7-13; Es-Saady et al., 1996, Anticancer Res. 16:481-486; Paik et al., 1998, Arch. Pharm. Res. 21:398-405]. 우르솔산은 또한 종양 세포에서의 세포소멸을 유발하는 것으로 밝혀졌다. 문헌[Baek et al., 1997, Int. J. Cancer 73:725-728]. 우르솔산과 우르솔산의 밀접한 관련이 있는 구조 유사체인 올레아놀산 모두는 포발 에스테르에 의해 마우스 피부에서 유발되는 종양 자극을 억제하는 것으로 밝혀졌다. 문헌[Tokuda et al., 1986, Cancer Lett. 33:279-285; Huang et al., 1994, Cancer Res. 54:701-708]. 또한, 이들 양 화합물은 지질 과산화 반응을 억제하는 것으로 밝혀졌으며, 이는 암 개시 및 자극 중에 자유 라디칼 손상을 억제할 수도 있다. 문헌[Balanehr and Nagarajan, 1991, Biochem. Int. 24:981-990].

또한, 우르솔산은 기질 금속단백분해 효소[문헌: Cha et al., 1998, Oncogene 16:771-778] 및 엘라스타제[문헌: Ying et al., 1991, Biochem. J. 277:521-526]을 축소조절(downregulate)하는데, 이들은 종양 침습[문헌: Cha et al., 1996, Cancer Res. 56:2281-84] 및 피부에서의 손상과 관련된 염증[문헌: Ying et al., 1991, Biochem. J. 277:521-526]을 예방하는 메카니즘을 제공할 수 있다.

우르솔산 및 다수의 트리테르페노이드 유도체는 저지혈증 및 항-아테롬경화증 특성을 갖는 것으로 나타났다. 문헌[Liu, 1995, J. Ethanopharmacol. 49:57-68]. 우르솔산 및 올레아놀산은 아테롬경화증의 동물 모델에서 혈중 콜레스테롤 및 β -당단백질의 농도를 40-50% 감소시킨다. 문헌[Liu, 1995, J. Ethanopharmacol. 49:57-68]. 종래 기술의 이해와 밀접하게, 국소 우르솔산은 표피의 과잉 증식 및 염증을 특징으로 하는 증상인 건선의 치료에 사용하는 것이 제안되었었다 (미국 특허 제4,857,554호). 사실상, 이러한 우르솔산 및 이의 유사체가 지질 생성을 저하시킬 수 있으며 건선의 치료에 사용될 수 있다는 종래 기술은 본 발명과 상이한 것으로서, 이러한 상반되는 효과의 발견은 예상밖의 것이며 신규한 것이 되었다. 문헌의 결과 및 종래 기술의 숙지와는 반대로, 본 발명자들은 우르솔산이 피부의 각질세포에 의해 지질, 특히 세라마이드 및 인지질의 생성을 증가시킨다는 사실을 발견하기에 이르렀다.

발명의 개요

본 발명은 지질 함량의 조절 치료를 요하는 포유동물(예, 사람)의 피부, 즉 노화, 광노화, 위축된 피부에 유효량의 우르솔산 화합물을 투여하는 것을 포함하는 포유동물 피부의 지질 함량 조절 방법을 제공한다. 상기에서 논한 바와 같이, 피부의 지질은 표피층에 위치하기 때문에, 피부의 지질 함량의 조절은 표피층 내에서 이루어진다.

또다른 구체예에서, 본 발명은 포유동물 피부에서의 광노화 또는 노화 과정의 특정 상태를 복귀시키는 방법을 제공하며, 또다른 구체예에서, 본 발명은

(a) 로션, 겔 등과 같은 국소 투여를 위해 적절한 매질 중의 유효량의 우르솔산 화합물,

(b) 리포솜 중에 캡슐화된 유효량의 우르솔산 화합물, 및/또는

(c) 로션, 겔 등과 같은 국소 투여를 위해 리포솜 중에 캡슐화되고 적절한 매질에 혼합된 유효량의 우르솔산 화합물의 국소 적용을 포함하는, 가능성이 향상되며, 차단 기능을 증강시키고, 활력을 개선시키거나 또는 포유동물 피부에서의 지질 결핍증을 치료하는 방법을 제공하는 것이다.

전술한 바와 같이, 우르솔산 화합물은 물을 비롯한 많은 용매 중에서 불용성이 크기 때문에, 리포솜 중의 화합물을 투여하는 것이 본 발명의 매우 바람직한 실시태양이 된다.

도면의 간단한 설명

도 1은 도 1A는 미처리, 도 1B는 1% (v/v) 공 리포솜, 도 1C 및 도 1D는 매질 중의 우르솔산의 최종 농도가 40 μ M인 4 mM의 농도에서 우르솔산을 혼합한 것을 제외하고, 공 리포솜과 동일한 것인 1% 4 mM 우르솔산 (URA) 리포솜으로 처리한 것인 배양된 정상 사람 표피 각질세포(NHEK)의 현미경 사진이다. 세부 사항은 실시예 1에 기재되어 있다.

도 2는 미처리된 배양 정상 사람 표피 각질세포(NHEK), 1% (v/v) 공 리포솜으로 처리한 배양된 NHEK 또는 1% 4 mM의 우르솔산 리포솜으로 처리한 배양된 NHEK에 대한 세포당 포스파티딜콜린의 함량을 도시한다. 세부 사항은 실시예 1에 기재되어 있다.

도 3은 미처리된 배양 정상 사람 표피 각질세포(NHEK), 1% (v/v) 공 리포솜으로 처리한 배양된 NHEK 또는, 1% 4 mM의 우르솔산 리포솜으로 처리한 배양된 NHEK에 대한 세포당 포스파티딜에탄올아민의 함량을 도시한다. 세부 사항은 실시예 1에 기재되어 있다.

도 4는 미처리된 배양 정상 사람 표피 각질세포(NHEK), 1% (v/v) 공 리포솜으로 처리한 배양된 NHEK 또는, 1% 4 mM의 우르솔산 리포솜으로 처리한 배양된 NHEK에 대한 세포당 유리 지방산의 함량을 도시한다. 세부 사항은 실시예 1에 기재되어 있다.

도 5는 미처리된 배양 정상 사람 표피 각질세포(NHEK), 1% (v/v) 공 리포솜으로 처리한 배양된 NHEK 또는, 1% 4 mM의 우르솔산 리포솜으로 처리한 배양된 NHEK에 대한 세포당 완전 세라마이드의 함량을 도시한다. 세부 사항은 실시예 1에 기재되어 있다.

도 6은 미처리된 배양 정상 사람 표피 각질세포(NHEK), 1% (v/v) 공 리포솜으로 처리한 배양된 NHEK 또는, 1% 4 mM의 우르솔산 리포솜으로 처리한 배양된 NHEK에 대한 세포당 완전 글리코실세라마이드의 함량을 도시한다. 세부 사항은 실시예 1에 기재되어 있다.

도 7은 미처리된 배양 정상 사람 표피 각질세포(NHEK), 1% (v/v) 공 리포솜으로 처리한 배양된 NHEK 또는, 1% 4 mM의 우르솔산 리포솜으로 처리한 배양된 NHEK에 대한 세포당 콜레스테롤의 함량을 도시한다. 세부 사항은 실시예 1에 기재되어 있다.

도 8은 공 리포솜 로션으로 처리한 인접 부위에 대한 3 일 및 11 일간 히드로겔 로션증의 0.3% 또는 1% 우르솔산 리포솜으로 처리후의 사람 피부에서의 추출성 세라마이드의 함량을 도시한다. 우르솔산 리포솜의 농도는 각각 10 μ M 및 30 μ M의 히드로겔 로션 중의 우르솔산의 최종 농도를 산출한다.

발명의 상세한 설명

본 발명의 화합물 및 조성물은 정상 사람 표피 각질세포의 인지질 함량을 효과적으로 그리고 효율적으로 증가시킨다. 또한, 본 발명의 화합물 및 조성물은 정

상 사람 표피 각질세포의 유리 지방산 함량 및 세라마이드와 글리코실세라마이드 함량을 증가시킨다. 인지질, 유리 지방산, 세라마이드 및 글리코실세라마이드 함량의 증가는 우르솔산의 효과에 의한 것이며, 이는 지질 담체의 임의의 효과 이상의 것이다.

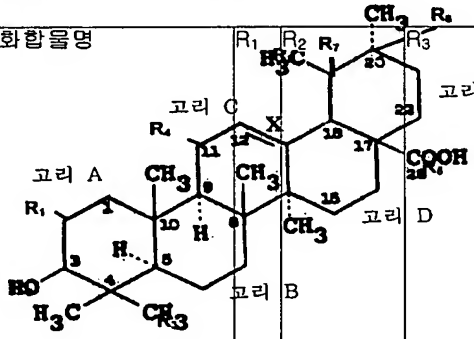
표피 각질세포의 지질 함량 증가로 인해서 여러가지의 결과가 도출된다. 첫번째, 인지질 함량의 증가는 세포 노화를 예방하며, 증식을 자극하고, 이는 세포 생육성이 증가되고 표피 두께가 증가되는 것으로 해석된다. 두번째, 유리 지방산 함량의 증가는 인지질, 트리글리세라이드, 글루코세라마이드, 세라마이드 및 아실세라마이드를 비롯한 수종의 지질 분획의 증가와 관련되어 있다. 표피 각질세포의 지질 함량의 증가는 노화와 관련되어 있는 지질 감소를 복귀시킨다. 세번째로, 각질세포의 글루코세라마이드, 세라마이드 및 아실세라마이드 함량의 증가로 인해서 차단 기능이 개선된다. 즉, 개선된 차단 기능은 아토피성 피부염을 감소시키며, 자외선 조사, 독성 화학물질, 독소 및 자극물질을 비롯한 많은 자극원의 영향으로부터 피부 및 신체를 보호하게 된다. 네번째, 세포 노화를 예방하고 차단 기능을 증가시킴으로써 노화의 영향을 복귀시킨다. 다섯번째, 인지질의 증가는 피부에서의 인지질에 대한 UV-B의 상실된 효과를 직접적으로 복귀시키며, 그로 인하여 세포성 증식으로 해석되는 생육성이 증가되며 광노화의 영향을 감소시킨다.

본 발명의 발견을 체형하게 되는 본 발명의 사용자의 예로는, 비늘버짐 및 어린선양 피부병을 앓고 있는 환자, 급성 피부 건조증 환자, 피부 위축증 및 레티노이드 피부병 환자, 여드름 환자, 노화 및 광노화 피부를 갖는 환자 등이 있다. 이러한 증상 모두는 피부 지질에서의 감소, 특히 각질세포에 의해 생성되는 것 및 특히 세라마이드의 감소, 무상해 각질층의 두께 및 균일도의 감소 및 피부 차단 기능의 상실에서 공통적이다. 결과적으로, 본 발명의 사용자는 경표피 수분 상실 및 피부 건조증 감각이 증가되는 병리학적 증상을 공유하고 있다.

본 발명에 의한 활성 화합물은 우르솔산 화합물이다. 이러한 화합물의 예는 하기 표 1에 기재되어 있는데, 본 발명은 표 1에 기재된 예에 국한되는 것은 아니나, 포유동물의 피부에 적용시 본 발명의 유효한 지질 조절 효과를 달성하는 모든 우르솔산 화합물을 포함하는 것으로 이해하여야 한다.

[표 1]

대표적인 우르솔산 화합물

화학물명	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	R ₈	X	고리 E
										
우르솔산	H	OH	CH ₃	H	COOH	H	H	CH ₃	-엔	헥실
올레아놀산						CH ₃		H		
에리트로디올					CH ₂ O	CH ₃		H		
12,13-에폭시 올레아놀산						CH ₃		H	-에폭시	
우바올					CH ₂ O					
헤데라게닌			CH ₂ O			CH ₃				
코로솔산	OH									
유스카프산	OH						OH			
18β-글리시레트산				O=	CH ₃	COOH		H		
카르베녹솔론		CO(CH ₂) ₂ -CO ₂ H		O=		COOH		H		
글리시레톨				O=	CH ₃	CH ₂ O				
베룰린					CH ₂ O		COOH	H		펜틸
베룰린산							COOH	H		펜틸
루판					CH ₃		COCH ₂	H		펜틸
뉴 루판					CH ₂ O		COCHO	H		펜틸

우르솔산은 기준 화합물이다. 표의 빈칸은 해당 위치가 우르솔산과 동일하다는 것을 의미한다.

표 1에는 이러한 족의 화합물에 대해 공통인 화학 구조가 기재되어 있다. 기준 화합물인 우르솔산은 표 1의 두번째 라인에 도시된 바와 같이 표시된 위치에서 치환체를 갖는다. 우르솔산의 아래에 기재된 각각의 유사체/유도체는 우르솔산과 표시된 위치만이 상이하다. 표 1에서 빈칸은 이들 위치의 치환체가 우르솔산과 동일하다는 것을 나타낸다. 이러한 표 1에서 알 수 있는 바와 같이, 이들 화합물은 5중환 구조의 고리 A, B 및 C에서 상당한 유사성을 공유하고 있다. 이러한 고리의 임의의 위치에서의 첨가, 예를 들면 카르베녹실론에서의 고리 A의 R₂ 위치에서의 헤미숙시네이트는, 첨가에 의해 달성될 수 있는 용해도의 증가에도 불구하고 화합물의 효능을 감소시킨다. 반대로, R₆ 위치에서의 커다란 알킬기를 비롯한 고리 E의 많은 변형 및, 핵심 고리 대신에 펜탈의 치환 등을 조절할 수가 있다. R₄ 위치에서의 옥소 첨가는 화합물의 전해질코르티코이드 활성을 증가시키며, 향이노 또는 수분 보유가 바람직하거나 또는 해롭지 않은 경우에만 바람직하다.

전술한 바와 같이, 본 발명의 방법 및 조성물은 각종의 용도를 위한 활성 성분으로서 우르솔산 화합물(이는 전술한 바와 같이 화합물의 조합(혼합)이 될 수도 있음)을 사용한다. 바람직한 구체예에서, 활성 성분은 허용 가능한 제제에 국소 제공된다. 특히 바람직한 제제는 우르솔산 화합물을 리포솜에 혼입시키는 것이다. 각종의 다양한 지질을 다양한 농도로 사용하여 리포솜을 형성하며, 여기서 리포솜의 예는 문헌[Liposome Technology, Gregory Gregoriadis 편저, CRC 프레스 인코포레이티드, 미국 플로리다주 보카 라톤, 1984]에 기재되어 있다. 또한, 본 발명은 우르솔산 화합물 단독의 혼입 또는 리포솜 중에 혼입되어 로션, 겔, 크림 또는 표피에 활성 성분을 흡수시키도록 하는 기타의 허용 가능한 제제에 관한 것이다.

리포솜 제제가 바람직하는데, 이는 우르솔산이 대부분의 용매, 특히 물에서 불용성이 크며 통상의 유화제, 예컨대 LECINOL S-100이 효과가 적기 때문이다. 본 발명에 의하면, 이러한 불용성의 문제는 리포솜의 인지질 이중층막 중의 지질 꼬리 사이에 이를 적층시키기 위하여 우르솔산의 평면 구조를 이용함으로써 해소된다. 인지질의 하전된 헤드기로 인해서, 우르솔산을 함유하는 리포솜은 물에 쉽게 용해된다.

그러나, 리포솜막의 지질 이중층의 꼬리내 제한된 수의 부위만이 우르솔산의 적층에 사용된다. 우르솔산:지질 성분의 바람직한 비는 실험에 의하여 측정하여야만 한다. 예를 들면 우르솔산:포스파티딜콜린 및 콜레스테롤의 바람직한 비는 약 1.5 (1.0~3.0):10:1.9 (w/v)이다. 저농도의 우르솔산에서는 포유동물 피부의 표피층에 의한 지질 생성의 효과가 쉽게 발생하지는 않는다. 고 농도 범위의 우르솔산 농도에서는 리포솜막으로 분배되는 기타의 화합물이 제제에 포함되지 않게 되는데, 이는 기타의 화합물이 우르솔산을 대체하고 그리하여 침전을 발생시키기 때문이다.

예를 들면, 1%의 추천 농도에서의 친유성 방부성 펜옥시에탄올의 봉입은 제제 중에 형성되는 우르솔산 침전물을 생성한다. 그러므로, 리포솜 중에서의 유효 농도의 우르솔산 및 친유성 방부제의 유효 농도를 달성하는 것은 곤란하다. 우르솔산 리포솜과 적합성을 갖는 바람직한 방부제는 리포솜 막으로 분배되지 않는 수용성 방부제가 있다. 본 발명의 실시예에 사용될 수 있는 이와 같은 수용성 방부제로는 칼륨 소르베이트가 있다. 기타의 수용성 방부제의 예는 문헌[Cosmetic and Drug Preservation, Principles and Practices, J.J. Kabara 편저, 마셜 데커, 인코포레이티드, 뉴욕, 1984]에서 찾아볼 수 있다.

마찬가지로, 리포솜,우르솔산 조성물로의 기타의 첨가제는 리포솜으로부터 우르솔산을 대체하지 않아야 하며, 이러한 첨가제의 바람직한 형태로는 수용성이여야 하며, 그렇지 않을 경우에는 리포솜으로부터 격리된다.

투여량 선택은 처치하고자 하는 증상의 경중도 및 반응성과 같이 쉽게 측정할 수 있는 다수의 요인에 의해 결정되나, 통상적으로는 하루 1 회 이상, 수일 내지 수개월동안 지속적으로 처치하거나 또는 희망하는 반응이 얻어질 때까지 또는, 치유가 나타나거나 또는, 증상의 개선 또는, 질환 상태의 축소가 달성될 때까지 실시한다. 당업자라면 최적의 투여량, 투여 방법론 및 반복을 등을 용이하게 결정할 수 있을 것이다. 일반적으로, 본 발명에 의한 조성물을 위한 단위 투여량은 리포솜 또는 대체의 담체내에서 우르솔산 화합물 0.1 mM~10 mM을 함유하며, 리포솜 또는 담체는 로션 또는 대체의 국소 제제의 1~90 중량%를 함유한다. 몇몇의 경우에 있어서, 리포솜 또는 대체의 제제는 피부에 최대 강도로 적용하는 것이 바람직할 수 있다.

필요할 경우, 우르솔산 화합물은 제제 중에 기타의 활성 성분과 혼합될 수 있다. 예를 들면, 레티노이드 및 국소 스테로이드는 피부 위축의 바람직하지 못한 부작용을 지닐 수 있다. 이러한 부작용은 우르솔산 화합물과 상기 제제를 병행 투여함으로써 완화될 수 있다. 예를 들면 활성 성분 모두를 함유하는 로션과 같은 단일의 부형제를 사용하여 또는, 별도의 로션을 동시에 투여하거나 또는 어느 한 제제를 먼저 투여하는 순차적 투여가 가능한 별도의 부형제에 의해 수행될 수 있다. 또다른 예로서, 우르솔산 화합물은 썬블록과 함께 혼합되어 일광차단 제품을 형성할 수 있다.

본 발명의 방법 및 조성물의 용도 및 유용하고도 신규한 특징은 이하의 비제한적인 실시예에 의하여 추가로 이해될 것이다.

실시예 1

리포솜의 제조

우르솔산 함유 리포솜 및, 우르솔산을 포함하지 않는 공 리포솜을 하기와 같이 제조하였다. 포스파티딜콜린(두산) 0.393 g 및 콜레스테롤(아반티) 0.077 g을 에탄올 20 mL에 용해하고 이를 분액 10 mL로 분할하였다. 우르솔산(시그마-알드리치) 60 mg를 하나의 분액에 용해하고, 이를 우르솔산 리포솜을 생성하는데 사용하였다. 공 리포솜으로 표시한 분액에는 아무 것도 첨가하지 않았다. 각 혼합물 7 mL를 30 \pm G 바늘을 통해 저온 1XPBS 10 mL에 주사하였다. 생성된 혼합물을 2 시간 동안 1XPBS 2 L에서 투석시킨 후, 방배 새로운 1XPBS 배취 중에서 투석하였다. 리포솜을 회수하고, 우르솔산 함량을 고성능 박층 크로마토그래피(HPTLC)로 RP-18 F₂₅₄ SHPTLC 플레이트(머크)를 사용하여 측정하였다. 우르솔산을 메탄올에 용해시켜 일련의 표준물을 만들었다. 리포솜을 HPTLC 플레이트에 직접 가하였다. 이동상은 100% 메탄올이었다. 크로마토그램은 삼염화안티몬을 분무한 후, 100 $^{\circ}$ C에서 5 분간 가열하여 가시화하였다. 염색시킨 크로마토그램의 사진을 촬영하고, QUANTISCAN 조명 분석 소프트웨어에 의해 스폿을 분석하였다. 우르솔산 리포솜은 4 mM의 우르솔산을 함유한다.

세포 배양 및 처리

정상 사람 표피 각질세포(NHEK)는 클로네텍스 바이오위태커로부터 입수하고, 이를 제조업자의 지시에 따라 KGM-2 매체(클로네텍스 바이오위태커) 중에서 배양하였다. 처리 개시 4 일전에 10⁵ NHEK를 KGM-2 매체 10 mL 중의 10 cm² 코닝 세포 배양 접시 6 개 각각에서 평판배양하였다. 이틀후 그리고 처리 1일째에 매체를 새로운 매체 10 mL로 교환하였다.

처리 1 일째에 공 리포솜 100 μ L를 2 개의 접시 각각에 첨가하고, 4 mM의 우르솔산 리포솜 100 μ L를 2 개의 접시 각각에 첨가하였다. 그리하여, 공 리포솜 및 4 mM 우르솔산 리포솜 처리 각각은 1% 리포솜을 수용하였으며, 우르솔산 리포솜 처리 중의 우르솔산의 최종 농도는 40 μ M이었다. 처리 개시후 4 일째에 모든 처리는 신선한 매체 및 리포솜을 수용하였다.

처치 개시후 8 일째에 세포를 수거하였다. 매질을 제거하고, 세포를 클로네틱스 바이오워터커 행크스 완충 염수액(HBSS) 10 ml로 세정한 후, HBSS 5 ml를 첨가하고, Northern Exposure 컴퓨터 영상화 시스템에 연결된 카메라가 장착된 니콘 현미경을 사용하여 세포 사진을 촬영하였다. 사진 촬영후, HBSS를 제거하고, 클로네틱스 트립신/EDTA 6 ml를 첨가하고, 세포가 점시로부터 분리될 때까지 세포를 37℃에서 6 분간 항온배양하였다. 그후, 클로네틱스 트립신 중화액을 첨가하고, 세포를 완전 혼합하고, 15 ml 원추형 시험관에 옮겼다. 현탁된 세포의 1/2 ml를 Isoton I 119.5 ml에 첨가하고, 모델 ZBI 쿨터 계수기로 계수하였다. 나머지 세포를 178X g에서 5 분간 원심분리하여 펠릿으로 만들었다. 상청액을 제거하고, 세포를 1XPBS 5 ml에 재현탁시키고, 테플론 라이닝 처리된 뚜껑이 있는 파이렉스 시험관에 옮긴 후, 이를 지질 추출을 위해 펠릿으로 만들었다.

지질 추출법

지질은 문헌[Ponec and Weerheim, 1990, Meth. Enzymol. 190:30-41]에 의해 개발된 방법으로 추출하였으나, 문헌[Bligh 및 Dyer, 1959, Canad. J. Biochem. Physiol. 37:911-917]에 의해 개발된 방법으로 변형시켰다. 펠릿화된 세포를 클로로포름:메탄올(2:1) 2 ml로 60 분간 실온(RT)에서 LABQUAKE 회전 혼합기로 혼합하여 추출하였다. 세포 조직파편을 펠릿화하고, 상청액을 수집한 후, 펠릿을 클로로포름:메탄올:탈이온수(1:2:0.5) 2 ml로 60 분간 37℃에서 재추출한 후, 클로로포름:메탄올(1:2) 2 ml로 30 분간 실온에서, 클로로포름:메탄올(2:1) 2 ml로 30 분간 실온에서 그리고 클로로포름 2 ml로 15 분간 실온에서 재추출하였다. 추출액을 합하고, 이를 2.5%의 KCl 200 μ l와 와동 처리로 혼합한 후, 이를 탈이온수 2 ml로 10 분간 실온에서 혼합하였다. 상부 수성층 및 하부 추출층 모두를 깨끗한 시험관에 옮기고, 수성층을 클로로포름 4 ml로 10 분간 실온에서 혼합하면서 재추출하였다. 이 클로로포름 추출액을 이전의 추출액과 혼합하였다. 합한 추출액을 50℃의 수조에 두고, 질소 흐름하에 건조시켰다. 펠릿을 클로로포름(2):메탄올(1) 500 μ l 중에 용해시키고, 이를 질소하에 -20℃에서 테플론 라이닝 처리된 바이알에 보관하였다.

사람 피부 중의 지질을 분석하기 위해, 문헌[Bonte, F.A., Saunois, P. Pinguet and A. Meybeck, Arch. Dermatol. Res. 289-78:82, 1997]에 기재된 프로토콜을 변형시킨 것을 사용하여 피검체로부터 지질을 추출하였다. 처치후, 추출하고자 하는 전박 부위를 수돗물로 우선 세정하고, 이를 깨끗이 말린 후, Scotch™ 810 Magic™ 테이프를 1회 붙였다가 떼어낸다. 50 ml 폴리프로필렌 원추형 시험관의 상부 1 인치를 절개한 것을 피검체 추출 동안 용매의 저장용기로 사용하였다. 저장용기를 팔에 두고 강하게 잡고, 시클로헥산:메탄올(4:1) 1 ml를 첨가하고, 이를 1 분간 가볍게 교반하였다. 용매를 제거한 후, 이를 테플론 라이닝 처리된 뚜껑이 있는 파이렉스 시험관에 넣었다. 시클로헥산:메탄올(1:1) 1 ml를 저장용기에 첨가하고, 이를 1 분간 교반하고, 제거한 후, 1차 추출물을 함유하는 시험관에 첨가하였다. 시험관을 50℃에서 질소 기체하에 전술한 바와 같이 건조시켰다. 건조된 추출물을 클로로포름:메탄올(2:1) 200 μ l에 용해시켰다. 지질 용액을 테플론 라이닝 처리된 뚜껑이 있는 작은 보관용 시험관에 넣고, 이를 질소 가스로 세정한 후, -20℃에서 보관하였다.

박층 크로마토그래피법

포스파티딜콜린(PC), 포스파티딜에탄올아민(PE), 콜레스테롤(CH), 완전 세라마이드(α -히드록시 세라마이드 + 비-OH 세라마이드)(Cer), 완전 글리코실세라마이드(GlyCer) 및 올레산을 각각 5 μ g/ μ l 함유하는 표준액을 만들었으며, 이는 유리 지방산(FFA)에 대한 표준 물질로서 통상적으로 사용된다. 이를 2.5 μ g/ μ l, 1.25 μ g/ μ l, 0.625 μ g/ μ l, 0.313 μ g/ μ l, 156 ng/ μ l 및 78 ng/ μ l로 연속적으로 희석하고, 이들 각각 5 μ l를 PC 및 PE의 경우에는 폴리에스테르 지지체가 있는 250 μ m 두께의 실리카 TLC 플레이트(시그마-알드리치)에서, FFA, CH, Cer 및 GlyCer의 경우에는 유리 지지체가 있는 150 μ m 두께의 실리카 HPTLC 플레이트(시그마-알드리치)에서 처리하였다. TLC 플레이트는 이동상으로서 클로로포름:메탄올:탈이온수 (65:30:5) 60 mm으로 실시하여 전개시켰다. HPTLC 플레이트는 FFA 및 CH의 이동상은 (i) 클로로포름 주행(run) 15 mm, (ii) 클로로포름-아세톤-메탄올(76:8:16) 주행 10 mm, (iii) 클로로포름-헥실 아세테이트-아세톤-메탄올(86:1:10:4) 주행 70 mm, (iv) 클로로포름-아세톤-메탄올(76:4:20) 주행 20 mm, (v) 클로로포름-디에틸 에테르-헥실 아세테이트-에틸 아세테이트-아세톤-메탄올(72:4:1:4:16:4) 주행 75 mm 및 (vi) 헥산-디에틸 에테르-에틸 아세테이트(80:16:4) 주행 90 mm의 순서로 전개시키거나[문헌: Ponec and Weerheim, 1990, Meth. Enzymol. 190:30-41] 또는, Cer 및 GlyCer의 이동상은 (i) 클로로포름-메탄올-물(40:10:1) 주행 30 mm, (ii) 클로로포름-메탄올-빙초산(190:9:1) 주행 75 mm, (iii) 헥산-디에틸 에테르-빙초산(80:20:10) 주행 75 mm, (iv) 석유 에테르 주행 85 mm의 순서로 전개시켰다[문헌: Kennedy et al., 1996, Pharmaceut. Res. 13:1162-1167]. TLC 플레이트를 건조시키고, 요오드로 염색한 후, 사진을 촬영하고, Quantascan 컴퓨터 조정 시스템을 사용하여 분석하였다. FFA 및 CH의 경우에는 HPTLC 플레이트를 건조시키고, 포스포몰리브덴산을 분무하고, 이를 120℃에서 2 분간 소성시키거나 또는, Cer 및 GlyCer의 경우에는 8%의 인산 중의 10% 황산구리를 분무하고, TLC 플레이트와 마찬가지로 분석하였다. 표준 염색의 강도는 0.625 μ g/ μ l 이상으로 선형인 것으로 밝혀졌으며, 이는 시료를 사용한 크로마토그래피 실시에서의 표준물질로서 사용하였다.

표준량의 추출물(5 μ l)을 사용하여 실시한 후 세포수에 대한 결과를 평준화하거나 또는, 표준 세포수(2.5×10^4 세포)에 상응하는 추출물량을 장입하여 시료를 실시한다. 이들 두 가지의 기법은 유사한 결과를 산출하였다. 표준 세포수로부터의 추출물을 사용하여 얻은 결과를 실시예에 기재하였다. TLC 및 HPTLC를 표준물에 대하여 상기에 기재된 것과 동일한 방식으로 실시하고, 염색한 후 정량화하였다. Instat 소프트웨어를 사용하는 스튜던트-뉴먼-쿨(Student-Newman-Keuls) Anova에 의해 통계 분석을 수행하였다.

결과 및 약리학적 적용

육안 검사 및 사진 기록(도 1)에 의하면, 1%의 4 mM 우르솔산 리포솜으로 처리한 NHEK 세포가 미처리 세포 또는, 공 리포솜으로 처리한 세포에 비하여 공포형성이 더 많이 이루어졌다는 것을 알 수 있다. 이러한 공포화는 지질의 축적을 비롯한 각종의 상태로부터 야기될 수 있다. 문헌[Robert et al., 1999, Int. J. Radiat. Biol. 75:317-326]. 하기의 지질 분석을 고려하면, 도 1에서 관찰된 공포는 지질 축적으로 인한 것으로 사료된다. 리포솜이 포스파티딜콜린 및 콜레스테롤을 함유한다는 사실에도 불구하고, 공 리포솜으로 처리한 NHEK의 공포형성은 거의 또는 전혀 증가하지 않았다는 것에 유의하여야만 한다. 그래서, 도 1에서 관찰된 공포형성은 우르솔산 리포솜으로 처리한 세포에 대하여서만 특징되는 것인데, 이는 우르솔산이 공포형성을 유발하는 원인이 된다는 것을 의미한다. 도 1에서의 사진이 처리 8일째에 촬영한 것이지만, 육안 관찰에 의하면, 우르솔산 리포솜으로 처리 개시후 이틀째 정도에서도 처리 세포에 상당한 공포형성이 뚜렷한 것으로 나타났다.

TLC 및 HPTLC에 의한 지질 함량 분석에 의하면, 우르솔산 리포좀이 미처리 NHEK에 비하여 NHEK에서 포스파티딜콜린(PC)의 2 배의 통계적 유의 증가분을 생성하는 것으로 나타났다(도 2). 이러한 리포좀이 PC를 함유한다는 사실에도 불구하고, 공 리포좀으로 처리한 NHEK에서는 PC의 증가가 없었다. 우르솔산 리포좀으로 처리한 NHEK는 포스파티딜에탄올아민(PE)의 1.3 배의 통계적 유의 증가분이 있었다(도 3). 공 리포좀으로 NHEK를 처리한 것은 PE의 13% 감소가 생성되었는데, 이러한 감소분은 통계적 유의성에 해당하지는 않는다. 공 리포좀은 유리 지방산(FFA)의 1.15 배 증가분을 생성하며, 우르솔산 리포좀은 FFA의 1.3 배 증가분을 생성하는데, 우르솔산 리포좀에 의해 유발된 FFA의 증가분은 통계적으로 유의성을 갖는다(도 4). 우르솔산 리포좀은 미처리된 세포에 비하여 완전 세라마이드 및 글리코실세라마이드를 급격하게 증가시킨다(도 5 및 도 6). 공 리포좀 또는 우르솔산 리포좀 중 어느 것도 세포에서의 콜레스테롤 수치를 증가시키지 않는다(도 7). 이러한 각질세포에서의 발견은 우르솔산이 콜레스테롤 수치를 강하시키며 우르솔산이 저지혈성이라는 보고를 고려하면 예상밖의 결과에 해당한다.

사람 피검체를 10 μ M 또는 30 μ M의 리포좀 우르솔산을 함유하는 로션으로 처리하면 세라마이드가 유발되며, 그리하여 일반적으로 히드록시-세라마이드가 비-히드록시 세라마이드보다 크게 증가되었다(도 8). 사실상, 처치 3 일 이후, 비-히드록시 세라마이드는 10 μ M 또는 30 μ M의 리포좀 우르솔산에 의해 약 12% 감소되었다. 반대로, 히드록시 세라마이드는 10 μ M 또는 30 μ M의 리포좀 우르솔산으로의 처치 3 일후 약 18%가 증가되었다. 처치 11 일 이후에는, 비-히드록시 및 히드록시 세라마이드가 10 μ M의 리포좀 우르솔산에 의해 약 30% 증가하였다. 그러나, 동일한 기간에, 비-히드록시 및 히드록시 세라마이드는 30 μ M의 우르솔산에 의하여 각각 7% 및 18%만이 증가되었다. 그래서, 30 μ M의 리포좀 우르솔산이 배양된 NHEK에서의 세라마이드 유발에 대하여 더 최적의 농도가 되는 반면, 사람의 피부에서는 10 μ M의 리포좀 우르솔산이 세라마이드 유발에 대하여 더 최적의 농도가 된다. 그러나, 세포 배양 처리가 매3일마다 1 회만 실시되는 반면, 사람 피부의 처리는 매일 2회씩 실시되었다. 그래서, 사람 피부에서의 세라마이드를 유발하는 리포좀 우르솔산의 능력은 이러한 치료 섭생에 의해 충족될 수 있다.

상기의 연구에 의하면, 특정의 지질의 조절은 피부에서의 기능적 그리고 미적 변화와 관련될 수 있다는 것을 알 수 있다. 예를 들면, 레티노이드를 사용한 피부 처리는 인지질을 증가시키며, 세라마이드를 감소시키고, 표피 세포의 노화를 저하시킨다. 그래서, 피부의 생육성 및 활력이 증가되면서 차단 기능이 감소된다. 게다가, 표피 세포층의 지질의 축적은 젊어보이게 하는 복원과 관련되어 있다.

레티노이드와 유사하게, 본 발명의 화합물은 세포에서의 인지질 수치를 증가시키게 된다. 그러나, 본 발명의 화합물을 리포좀에 혼합시킴으로써 차단 기능에 있어서 매우 중요한 역할을 하는 완전 세라마이드와 글리코실세라마이드를 비롯한 추가의 지질을 축적시키게 된다. 그리하여, 세라마이드 수치가 감소되는 레티노이드를 사용한 결과[문헌: Ponc and Weerheim, 1990, Meth. Enzymol. 190:31-40]와 달리, 피부의 차단 기능은 본 발명의 조성물에 의해서는 절충되지 않는다. 또한, 이러한 조성물은 인지질 합성을 자극하게 되어 세포 생육성을 증가시키게 된다. 그래서, 본 발명에 의한 우르솔산 화합물의 국소 투여는 노화와 광노화의 영향을 방지하며, 손상된 차단 기능과 기능부전성 각질층과 관련된 피부 건조증 질환을 치료하게 된다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

포유동물 피부의 표피 층의 지질 함량을 조절하는데 유효량으로 우르솔산 화합물을 피부에 국소 투여하는 것을 포함하는 포유동물 피부의 지질 함량을 조절하는 방법.

청구항 2.

제1항에 있어서, 포유동물의 피부는 표피층의 지질 함량 감소에 의한 노화가 진행중인 피부인 것인 방법.

청구항 3.

제1항에 있어서, 포유동물의 피부는 표피층의 지질 함량 감소에 의한 광노화가 진행중인 피부인 것인 방법.

청구항 4.

제1항에 있어서, 포유동물의 피부는 표피층의 지질 함량 감소에 의한 위축된 피부인 것인 방법.

청구항 5.

제4항에 있어서, 표피층의 지질 함량 감소는 피부에 1 종 이상의 레티노이드의 적용에 의한 것인 방법.

청구항 6.

제4항에 있어서, 표피층의 지질 함량 감소는 피부에 1 종 이상의 스테로이드의 적용에 의한 것인 방법.

청구항 7.

제1항에 있어서, 포유동물의 피부는 비늘버짐 또는 어린선양 피부병을 앓고 있는 것인 방법.

청구항 8.

제1항에 있어서, 포유동물의 피부는 여드름을 앓고 있는 것인 방법.

청구항 9.

제1항에 있어서, 포유동물은 피부의 표피층의 지질 함량의 감소로 인한 피부 건조증 감각을 갖는 것인 방법.

청구항 10.

제1항에 있어서, 우르솔산 화합물은 제제 형태로 투여되며, 제제중의 우르솔산 화합물의 농도는 30 μ M 이하인 것인 방법.

청구항 11.

제1항에 있어서, 우르솔산 화합물은 리포좀 중에 캡슐화되어 있는 것인 방법.

청구항 12.

제11항에 있어서, 우르솔산 화합물은 수용성 방부제를 함유하는 제제로 투여되는 것인 방법.

청구항 13.

제12항에 있어서, 수용성 방부제는 칼륨 소르베이트인 것인 방법.

- 청구항 14.**
제1항에 있어서, 우르솔산 화합물은 우르솔산인 것인 방법.
- 청구항 15.**
제1항에 있어서, 피부 표피층에서 세라마이드 지질층 중 성분 1 이상의 함량이 증가되는 것인 방법.
- 청구항 16.**
제1항에 있어서, 피부의 표피층의 유리 지방산의 함량이 증가되는 것인 방법.
- 청구항 17.**
제1항에 있어서, 우르솔산 화합물은 우르솔산 화합물이 아닌 1 종 이상의 기타의 활성 화합물과 조합되어 투여되는 것인 방법.
- 청구항 18.**
제17항에 있어서, 1 종 이상의 기타 활성 화합물은 레티노이드인 것인 방법.
- 청구항 19.**
제17항에 있어서, 1 종 이상의 기타 활성 화합물은 스테로이드인 것인 방법.
- 청구항 20.**
제1항에 있어서, 포유동물은 사람인 것인 방법.
- 청구항 21.**
표피층의 지질 함량의 감소로 인하여 노화가 진행중인 포유동물의 피부에서, 진행된 노화의 영향을 감소시키기에 유효량으로 이 피부에 우르솔산 화합물을 국소 투여하는 것을 포함하는 상기 피부의 치료 방법.
- 청구항 22.**
표피층의 지질 함량의 감소로 인하여 광노화가 진행중인 포유동물의 피부에서, 진행된 광노화의 영향을 감소시키기에 유효량으로 이 피부에 우르솔산 화합물을 국소 투여하는 것을 포함하는 상기 피부의 치료 방법.
- 청구항 23.**
표피층의 지질 함량의 감소로 인하여 위축된 포유동물 피부의 위축증을 감소시키기에 유효량으로 이 피부에 우르솔산 화합물을 국소 투여하는 것을 포함하는 상기 피부의 치료 방법.
- 청구항 24.**
제23항에 있어서, 위축된 포유동물 피부는 1 종 이상의 레티노이드를 사용한 치료로 인한 것인 방법.
- 청구항 25.**
제23항에 있어서, 위축된 포유동물 피부는 1 종 이상의 스테로이드를 사용한 치료로 인한 것인 방법.
- 청구항 26.**
여드름을 앓고 있는 포유동물의 피부에 여드름을 감소시키는데 유효량으로 우르솔산 화합물을 국소 투여하는 것을 포함하는 상기 피부 치료 방법.
- 청구항 27.**
비늘버짐 또는 어린선양 피부병을 앓고 있는 포유동물의 피부에 이러한 피부병을 감소시키는데 유효량으로 우르솔산 화합물을 국소 투여하는 것을 포함하는 상기 피부 치료 방법.
- 청구항 28.**
표피층의 지질 함량 감소로 인하여 피부 건조증 감각을 앓고 있는 포유동물의 피부에 이러한 건조증을 감소시키는데 유효량으로 우르솔산 화합물을 국소 투여하는 것을 포함하는 상기 피부의 치료 방법.
- 청구항 29.**
(i) 리포솜 중에 캡슐화된 우르솔산 화합물 및 (ii) 국소 투여용으로만 적합한 매질을 포함하는 포유동물 피부로의 국소 투여용 조성물.
- 청구항 30.**
제29항에 있어서, 수용성 방부제를 더 포함하는 것인 조성물.
- 청구항 31.**
제30항에 있어서, 수용성 방부제는 칼륨 소르베이트인 것인 조성물.
- 청구항 32.**
제29항에 있어서, 조성물 중의 우르솔산 화합물의 농도는 30 μ M 이하인 것인 조성물.
- 청구항 33.**
(i) 리포솜 중에 캡슐화된 우르솔산 화합물, (ii) 우르솔산 화합물이 아닌 1 종 이상의 기타 국소용 치료 활성 화합물 및 (iii) 국소 투여에 적합한 매질을 포함하는 포유동물의 피부에 국소 투여하기 위한 조성물.
- 청구항 34.**
제33항에 있어서, 1 종 이상의 기타 국소용 치료 활성 화합물이 레티노이드인 것인 조성물.

청구항 35.

제33항에 있어서, 1 종 이상의 기타 국소용 치료 활성 화합물은 스테로이드인 것인 조성물.

청구항 36.

제33항에 있어서, 수용성 방부제를 더 포함하는 것인 조성물.

청구항 37.

제36항에 있어서, 수용성 방부제는 칼륨 소르베이트인 것인 조성물.

청구항 38.

제33항에 있어서, 조성물 중의 우르솔산 화합물의 농도는 30 μM 이하인 것인 조성물.

요약

본 발명은 포유동물 피부의 지질 함량을 조절하기 위한 우르솔산 화합물의 국소 용도에 관한 것이다. 이러한 화합물은 리포솜 중에 캡슐화되어 예를 들면 로션 또는 겔 등과 같은 형태로 피부에 투여할 수 있다. 이러한 화합물은 레티노이드 및/또는 스테로이드의 국소 사용으로 인한 피부 위축증을 비롯한 피부 위축증, 노화, 광노화의 영향을 감소시키는데 유효하다. 또한, 본 발명은 우르솔산 화합물과, 기타의 국소용 치료 활성 화합물, 예컨대 레티노이드 또는 스테로이드를 포함하는 조성물에 관한 것이다.

도면

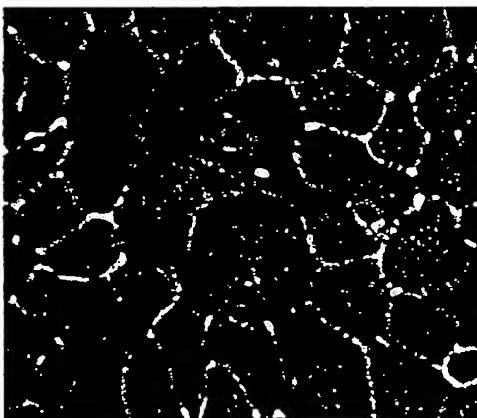
도면 1a

미처리



도면 1b

1% 공 리포솜



도면 1c

1% 4 mM URA 리포솜



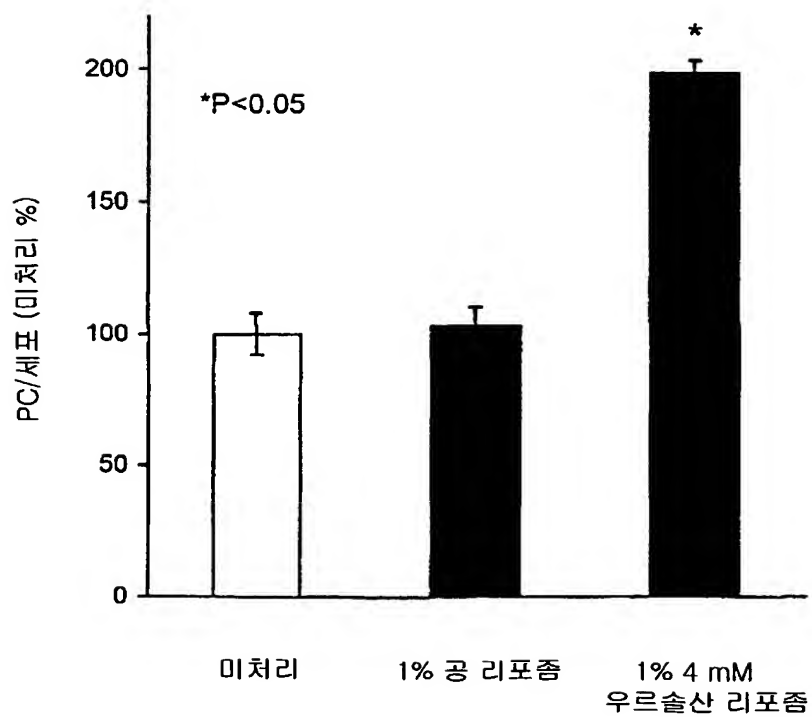
도면 1d

1% 4 mM URA 리포솜

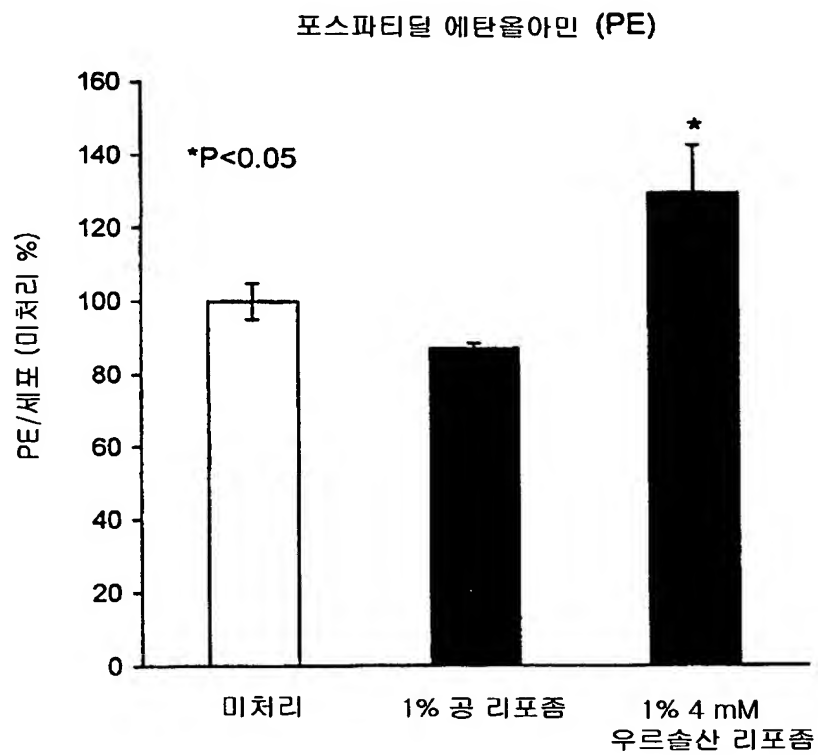


도면 2

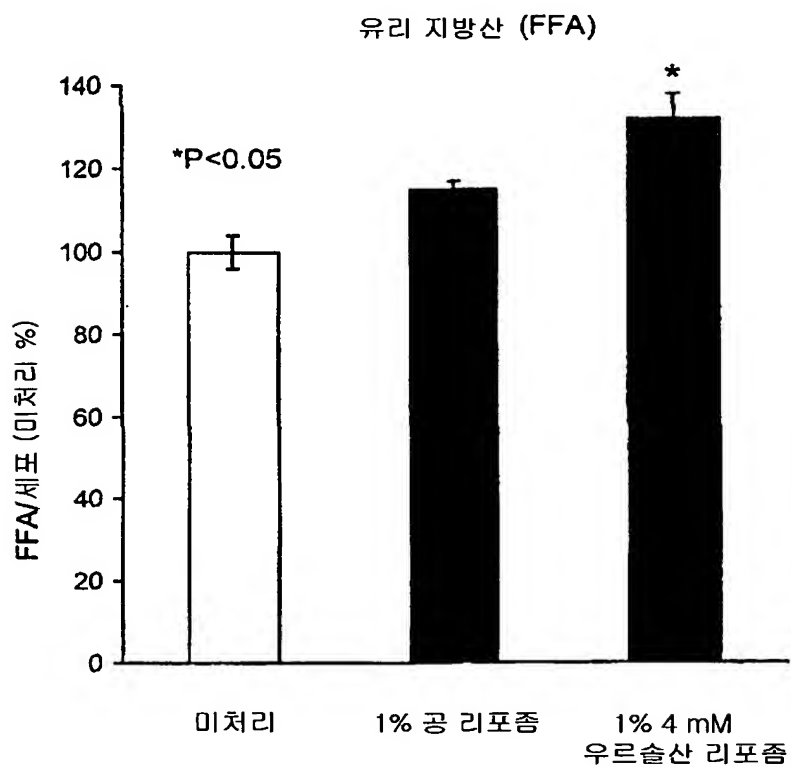
포스파티딜콜린 (PC)



도면 3

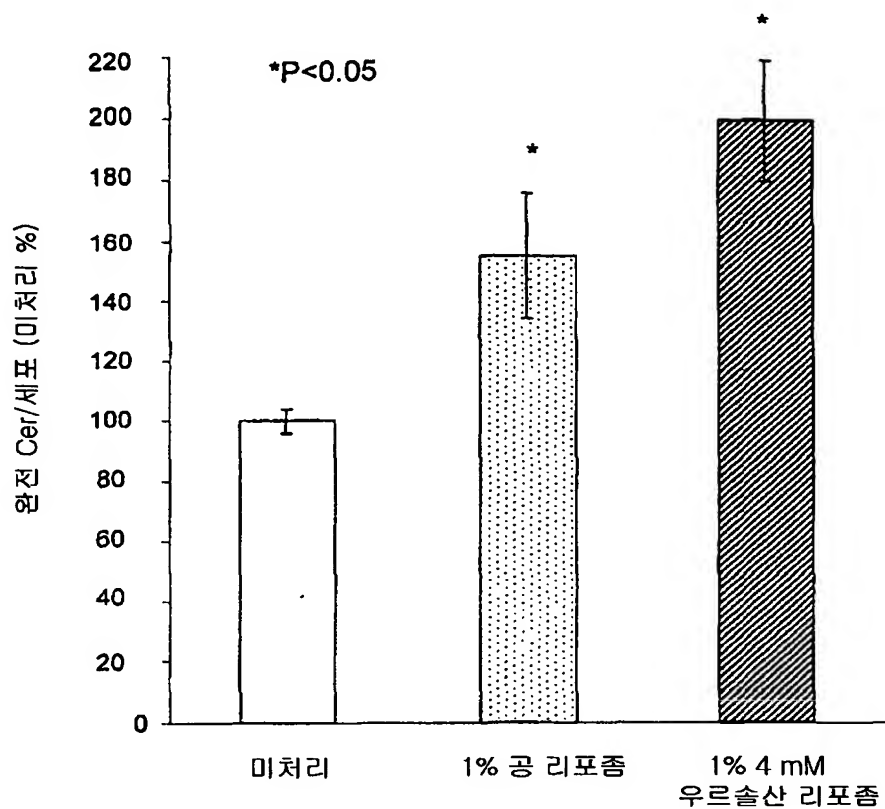


도면 4



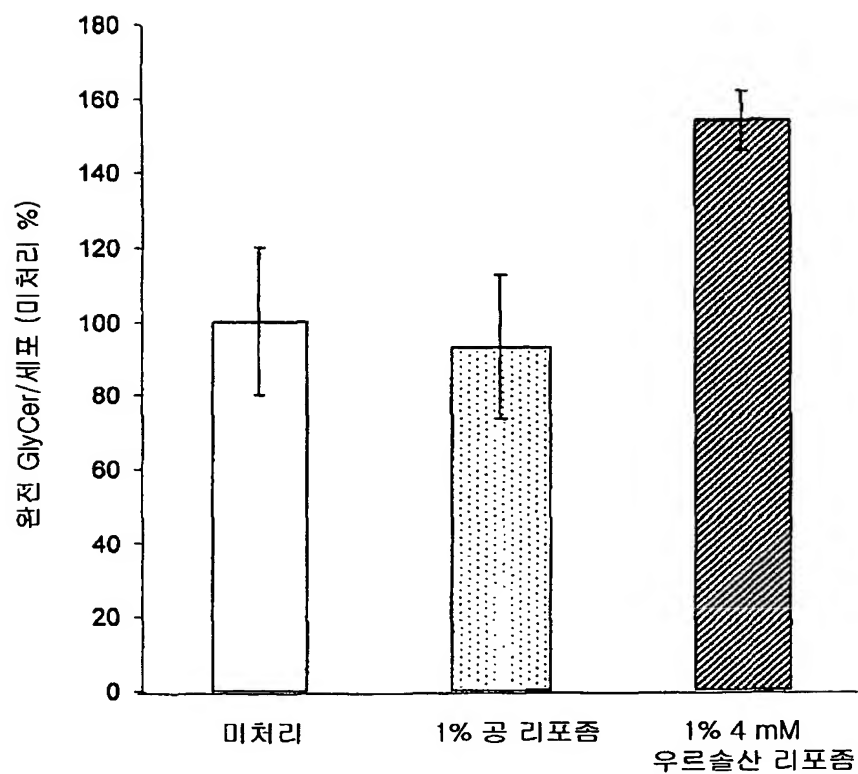
도면 5

완전 세라미드 (Cer)



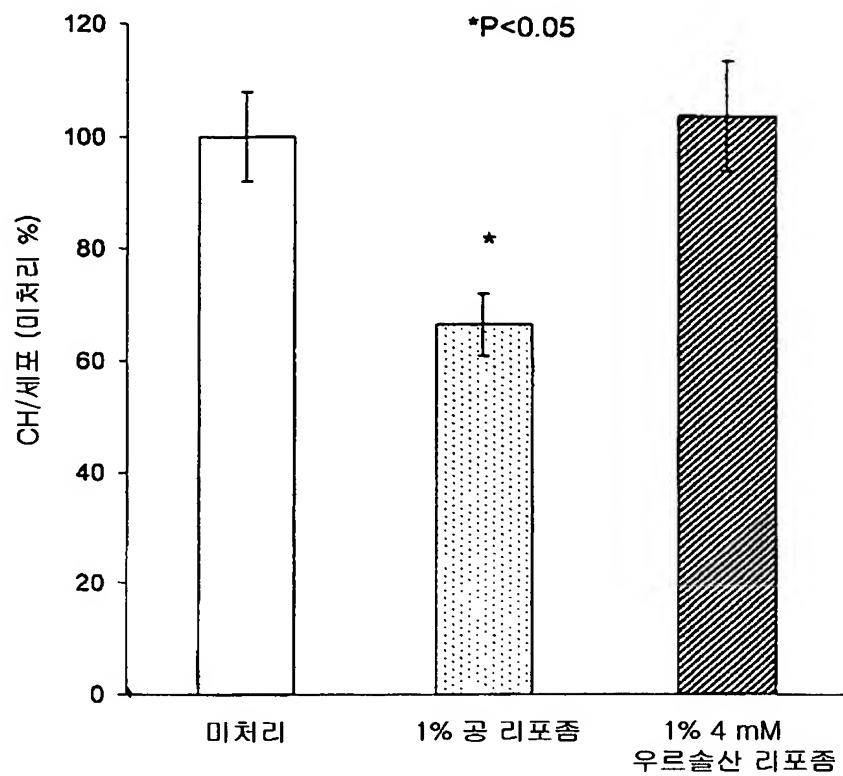
도면 6

완전 글리코실세라미드 (GlyCer)



도면 7

콜레스테롤 (CH)



도면 8

